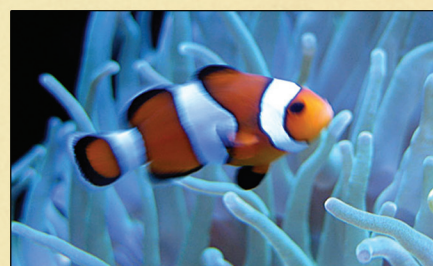
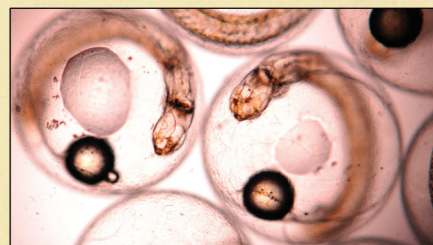


मात्स्यगंधा

2009

जलकृषि में जैव प्रौद्योगिकी की साध्यताएं

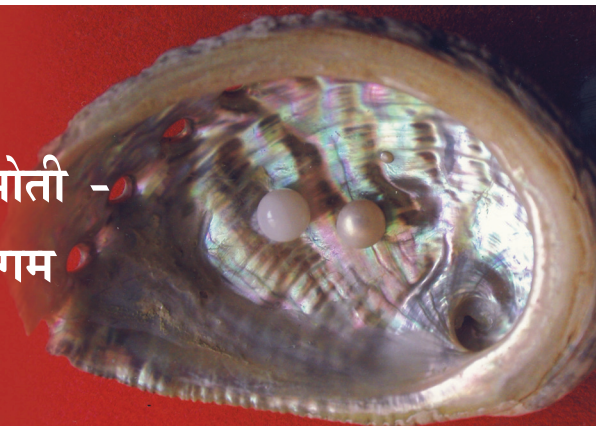
अंक 9, विशेष प्रकाशन सं. 102



केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान
(भारतीय कृषि अनुसंधान परिषद)
कोची 682 018



ऊतक संवर्धन द्वारा एबलोन से मोती - जैवपौद्योगिकी में एक नया अभिगम



सी.पी. सुजा

सी एम एफ आर आइ टूटिकोरिन अनुसंधान केंद्र, टूटिकोरिन, तमिल नाडू

भूमिका

प्राचीन काल से लेकर मान्नार खाड़ी के मोती विश्व प्रसिद्ध है। मोती नव रत्नों में एक है। नव रत्नों में सिर्फ मोती जीव से उत्पादित होता है। इसके प्राकृतिक सुन्दरता की वजह से सभी लोग इसे पसंद करते हैं। भारत में मुक्ता शुक्ति पिंकटाडा फ्यूकेटा (*Pinctada fucata*) से समुद्री मोती प्राप्त होते हैं। भारतीय समुद्रों में, मान्नार खाड़ी, जो किलकरी से कन्याकुमारी तक विस्तृत है, में दिखाए पड़नेवाले 'पार' में खूब मात्रा में मुक्ता शुक्तियाँ दिखायी पड़ती हैं। पाक उपसागर के विस्तृत रेतीले नितल भाग में और कच्छ की खाड़ी के 'खद्दास' नाम से जाननेवाले अंतराज्वारीय झाडियों में मुक्ता शुक्तियाँ पायी जाती हैं। अब भारतीय समुद्रों में मुक्ता शुक्ति की छः जातियाँ जैसे पिंकटाडा फ्यूकेटा, (*Pinctada fucata*) पी.मार्गरिटिफेरा, (*P. margaritifera*) पी.चेमनिट्सी, (*P. chinensis*) पी.सूगिलेटा, (*P. sugillata*) पी.अनोमियोडस (*P. anomiodontes*) और पी.

आर्टोपूरपुरिया (*P. artopurpurea*) मौजूद हैं। भारत में मौजूद वाणिज्यिक प्रमुख जातियाँ पी. फ्यूकेटा और पी. मार्गरिटिफेरा हैं जिन में मान्नार खाड़ी और कच्छ की खाड़ी में प्रमुख योगदान दी जानेवाली जाति है पी.फ्यूकेटा। काली अधर वाली मुक्ता शुक्ति पी.मार्गरिटिफेरा मुख्यतः आन्डमान के समुद्र में पायी जाती है।

मोती का उत्पादन करने वाले अन्य मोलस्क हैं प्टीरीया (*Pteria*) और एबलोन (*Abalone*)। बहुवर्ण के मोती और स्वदिष्ट मांस की वजह से एबलोन सबसे मूल्यवान समुद्री मोलस्क माना जाता है। भारतीय समुद्रों में एबलोन हालियोटिस वेरिया (*Haliotis varia*) बहुत कम संख्या में दिखाया पड़ता है।

अधिकांश लोग ऐसा सोचते हैं कि सीपी के अंदर बारिश का बूंद घुस जाता है और वहीं बूंद मोती बन जाता है। लेकिन यह सच नहीं है। आकस्मिक रूप से एक बाहरी वस्तु कवच और मैन्टिल के बीच पड़ जाने पर बाद में वह प्राकृतिक मोती बन जाता है। इस बाहरी वस्तु से होनेवाली पीड़ा या उत्तेजना को मिटाने के लिए मैन्टिल की एपिथीलियल कोशिकाएं नेकर लेयर (*nacre layer*) का उत्पादन करती हैं और यह मोती उत्पादन का कारक होता है। कृत्रिम वस्तुओं और मछली शल्क के चूर्ण से कृत्रिम मोती बनाया जाता है। नदियों में पाए जाने वाले मीठा

पत्रव्यवहार

सी.पी. सुजा,
वरिष्ठ वैज्ञानिक, सी एम एफ आर आइ टूटिकोरिन
अनुसंधान केंद्र, टूटिकोरिन, तमिल नाडू।



जल शंबुओं से मीठा जल मोती का उत्पादन किया जाता है। विशेष प्रकार प्रशिक्षण प्राप्त तकनीशियन मोती कवच (pearlcell) के मातृभाग जिसे (nucleus) कहा जाता है (ये यूनाइटेड स्टेट की मिसिसिपी नदी से संग्रहित मीठा जल शंबू कवच से प्राप्त होते हैं) और मैन्टिल ऊतक (mantle tissue) का छोटा सा टुकड़ा जिसे 'ग्राफ्ट' कहा जाता है, मिलाकर मुक्ता शुक्ति के अंडाशय में रखा जाता है। ये वस्तु बाद में मोती बन जाता है।

पालित और प्राकृतिक मोती की गुणता पानी की गुणता पर निर्भर होती है; प्रदूषित पानी में मोती का उत्पादन करना मुश्किल का काम है। इन समस्याओं का हल करने के लिए जैव प्रौद्योगिकीय तरीका एक ही उपाय है। जठरपाद मेलस्क, *हालियोटिस (Haliotis)* से प्राप्त होने वाले मोती विरल कोटि के और विश्व में ही सबसे सुन्दर मोती हैं। एबलोन में वृत्ताकार मोती के लिए केंद्रक का रोपण करना बड़ी मुश्किल का काम है। आधा मोती का उत्पादन आसान होने पर भी कवच काट करके मोती निकालने की वजह से एबलोन मर जाता है। पात्रे स्थिति में मैन्टिल ऊतक का संवर्धन करने पर नेकर उत्पादन की कोशिका रीति समझने में आसानी होती है और इस तरह इस विरल, सुन्दर और अमूल्य मोती का उत्पादन भी आसान होता है।

समुद्री अकशेरुकियों में 1940 के वर्षों से लेकर ऊतक संवर्धन प्रणाली प्रयुक्त की जाती है। ऊतक संवर्धन करते समय, कोशिका संरचना, कोशिका विभाजन, कोशिकोत्पादन, कोशिका शरीरक्रिया और कोशिका जीवंतता जैसे पहलुओं पर सूचनाएं संग्रहित की जानी चाहिए। कोशिका, ऊतक या अंगों के पात्रे संवर्धन के संरचनात्मक और व्यवहारिक पहलुओं पर अध्ययन करने के लिए ऊतक संवर्धन तकनीक सहायक होते हैं। साधारण ऊतकों और कैन्सर कोशिकाओं पर रासायनिकों और रेडियोएक्टिव घटकों के प्रभाव की जांच करने के लिए भी इन तकनीकों को प्रयुक्त किया जाता है। इन जाँचों के परिणाम कई प्रकार के रोगों का इलाज करने में सहायक निकल जाएंगे। हाल के वर्षों में,

मोती का उत्पादन करनेवाले मोलस्कों से मोती का पात्रे उत्पादन करने में ऊतक संवर्धन तकनीक उपयुक्त किया जाता है।

ऊतक संवर्धन प्रयोगशाला की तैयारी

सामान्यतः ऊतक संवर्धन प्रयोगशाला विभिन्न मोड्यूलों से सुसंहत और पूरी तरह स्वच्छता से युक्त और वातानुकूल होनी चाहिए। प्रवेश कमरा रिकार्डों के अनुरक्षण और संवर्धन करने से पहले की चर्चाएं करने के लिए उपयुक्त किया जाता है। प्रवेश कमरे से बाएं ओर अल्ट्रा वयलट रोगाणुनाशन एकक और बहते हुए पानी के प्रावधान से युक्त एनिमल स्टेरिलाइसेशन कमरा सजाया जाना चाहिए। प्रवेश कमरे के बाद प्रिपरेशन कमरा है जहाँ संवर्धन की तैयारियाँ, लवण विलयन, सार, ऊतक संवर्धन सामग्रियाँ आदि सजाकर रखी जाती हैं। प्रिपरेशन कमरे के बाद ड्रेसिंग कमरा और ओपरेशन कमरा या स्वच्छ कमरा तैयार किए जाने चाहिए। प्रिपरेशन कमरा, ड्रेसिंग कमरा और स्वच्छ कमरा के बीच एक डार्क चेम्बर जिसे 'पास बॉक्स' भी कहा जाता है, तैयार किया जाना चाहिए। इस कमरे के तीन द्वार और सामग्रियाँ हमेशा रोगाणु मुक्त होने के लिए ऊपर अल्ट्रा वयलट प्रकाश होते हैं। इस कमरे के तीन द्वार ऐसे सजाया जाना है कि एक प्रिपरेशन कमरे की ओर जहाँ रोगाणु मुक्त सामग्रियाँ रखी गयी हैं, दूसरा द्वार ड्रेसिंग कमरे की ओर खोला जाता है और तीसरा द्वार ओपरेशन कमरे की ओर खोला जाता है जहाँ संवर्धन की सामग्रियाँ तैयार करके रखी जाती है।

जीवों और ऊतकों की तैयारी

परीक्षण के जीवों को कम से कम तीन दिनों के लिए अल्ट्रा वयलट से उपचारित समुद्र जल में डालकर शुद्ध किया जाना चाहिए। इस तरह शुद्ध किए गए जीवों को बाहरी रूप से 70% आल्कोहल से पोंछकर स्वच्छ कमरे में लिया जाता है। परीक्षण जीवों के मैन्टिल ऊतक काटकर श्लेष्मा और अन्य आसंजक वस्तुओं को निकालने के लिए संतुलित लवण विलयन (BSS) में साफ किया जाता है। इसके बाद ऊतक को एक वर्ग



मि.मीटर के छोटे आकार में काट लिया जाता है।

संवर्धन तकनीक

फ्लास्क एवं पेट्री डिश संवर्धन

ऊतक के टुकड़े संवर्धन फ्लास्क के अंदर रखने से पहले फ्लास्क का मुँह रोगाणु मुक्त करने के लिए आइसोप्रोपनोल ज्वाला में दिखाया जाना है। ऊतकों को एक सूई के सहारे से फ्लास्क के अंदर रखा जाता है। ऊतक फ्लास्क के अंदरचिपकने के लिए 3 मि.लि.का मीडियम जोड़ दिया जाता है। पेट्री डिश में इसी तरह की संरोपण बनाया जाता है। संवर्धन प्लेटों को CO₂ ऊष्मायित्र में 25-28°C के तापमान में रखा जाता है।

सेल वेल (cell well) संवर्धन

सेल वेल को माइक्रो प्लेट भी कहा जाता है। विभिन्न प्रकार के सेल वेल होते हैं। 24 वेलों का आकार 16 मि.मी.का व्यास और 17 मि.मी.की ऊँचाई है और 96 वेलों का आकार 6.4 मि.मी. व्यास और 11 मि.मी. ऊँचाई है। सेल वेल को एक आवरण दिया जाता है। क्लोनिंग के लिए एक कोशिका का संवर्धन करने के लिए सेल वेल उपयुक्त किया जाता है। हर एक वेल में 3 से 4 बूँद मिडियम जोड़ दिए जाते हैं। सेल वेल को 25-28°C के तापमान में CO₂ ऊष्मायित्र में रखा जाता है।

मीडियम का समय समय पर बदलाव

एकांतर दिनों में मीडियम बदला जाता है। संवर्धन की स्थिति का आकलन करके मीडियम परिवर्तन की आवश्यकता निर्धारित की जा सकती है। संवर्धन फ्लास्क 70% आल्कोहोल से पोंछकर साफ किया जाता है, फ्लास्क खोलने पर ज्वाला में दिखाया जाना चाहिए। मीडियम का परिवर्तन करने पर ध्यान दिया जाना चाहिए। हर एक फ्लास्क के लिए अलग अलग पिपेट उपयुक्त किया जाना चाहिए। पहले, मीडियम का आधा भाग बदलने के बाद फिर पूरा मीडियम बदल देना चाहिए। सेल सस्पेंशन को सेंट्रिफ्यूज करके नया संरोपण बनाया जाता है।

कुछ स्थापित सेल लाइनों (cell lines) में कोशिकाएं जीवंत होने के कारण मीडियम का परिवर्तन किया जाता है।

संवर्धन प्रक्रिया

प्राथमिक संवर्धन (primary culture)

संसाधित ऊतक से कोशिका निकालने के लिए ऊतक को ट्रिप्सिन में डाला जाता है। इस के लिए ऊतक के टुकड़े 30 मि.लि मराइन मोलस्क काल्सियम मग्नीशियम फ्री फोस्फेट बफर सोल्यूशन (MM CMF PBS) और 0.05% ट्रिप्सिन से युक्त ट्रिप्सिनाइसेशन फ्लास्क में डाले जाते हैं। ऊतकों का उचित प्रकार वियोजन करने और कोशिकाएं ठीक प्रकार बिखेरने के लिए टेफ्लोन का विलोडक उपयुक्त किया जाना चाहिए। 10-15 मिनट विलोडन किया जाना है। कोशिका सस्पेंशन को पहले 150µm छालनी से और बाद में 60µm छालनी से निर्यंदन किया जाता है। निर्यंदित पदार्थ 5 मिनट के लिए 4°C तापमान में 800rpm में सेंट्रिफ्यूज किया जाता है और अवक्षेप को हिलाए के बिना द्रावक धीरे धीरे निकाल देता है। अवक्षेप में एक बूँद मिडियम डालकर अच्छी तरह मिश्रण किया जाता है। विलगन हुई कोशिकाओं से युक्त मिश्रण पास्चेर्स पिपेट द्वारा विभिन्न फ्लास्कों या पेट्री डिशों में डाल देता है। हर एक फ्लास्क में 3 मि.ली. मीडियम जोड़ने के बाद फ्लास्क 25-28°C तापमान में CO₂ ऊष्मायित्र में रखे जाते हैं।

कर्तौतकी संवर्धन (explant culture)

एक्सप्लान्ट ऊतक संवर्धन के लिए ऊतकों के खंड को संतुलित लवण विलयन (BSS) में संसाधन करके फ्लास्क या पेट्री डिशों में निवेशन किया जाता है। हर एक फ्लास्क में 3 मि ली मीडियम जोड़ दिया जाता है। कोशिकाओं का बड़ी मात्रा में प्रचुरोद्भव होता है और फ्लास्क के नितल भाग में आसंजित होती हैं। संवर्धन में वृत्ताकार एपिथीलियल जैसी और फाइब्रोब्लास्ट जैसी कोशिकाएं दिखायी पड़ती हैं। पात्रे संवर्धन में कोशिकाओं की संख्या बड़ी मात्रा में वर्धित होती है और एक सेल शीट बन



जाती है। पूर्ण रूप से सेल शीट बन जाने पर इसका उपसंवर्धन या हिमशीतीकरण किया जाना चाहिए। अनुकूल स्थितियों में कोशिकाओं में स्यूडोपोडिया (पादाभ) का विकास होता है और एक नेटवर्क के रूप में फ्लास्क के पूरे भाग में एक आधार द्रव्य (organic matrix) के रूप में आवृत होता है, यह जैविक आधार द्रव्य कोशिकाओं को क्रिस्टल के उत्पादन के लिए प्रेरित करता है।

अंग संवर्धन (organ culture)

संसाधन किए गए ऊतकों के खंड पेट्री डिश में एक रैफ्ट पर रखे जाते हैं। परीक्षण में आवश्यकता के अनुसार रैफ्ट की रूपकल्पना की जा सकती है। अंग संवर्धन में एक्सप्लान्ट ऊतक मीडियम में डूबा नहीं होता है, लेकिन ऊतकों के निम्न तल तक मीडियम भरा होना और ऊपरी भाग वायु में खुला होना चाहिए। कोशिकाओं को अपनी स्थिति में बाधा होने के बिना ऐसा ही रखा जाता है। इस स्थिति में जैविक आधार द्रव्य और पर्ल सैक बनता है। कोशिकाएं नेक्रियस क्रिस्टलों का उत्पादन करके आधार द्रव्य के ऊपर जमा करती हैं। मैन्टिल कोशिकाएं कवच का रूपायन करती हैं और ये षट्कोणीय आकृति में प्रिज़्मीय स्तर का उत्पादन करती हैं। हर एक षट्कोणीय खंड को अंतरापटलिका जैविक आधार द्रव्य का बोर्डर होता है।

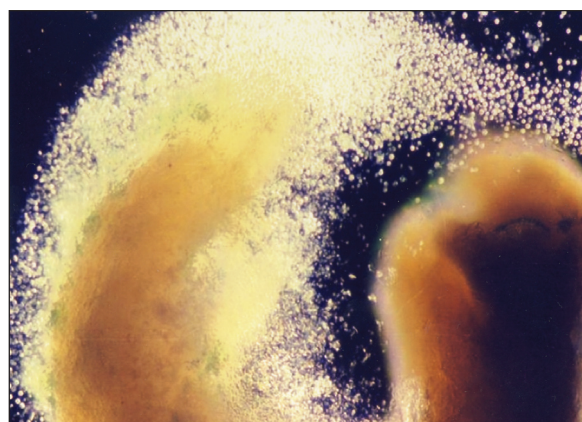
कोशिकाओं का परिरक्षण

कोशिकाओं को हिमीकरण द्वारा परिरक्षण करके 0.25% ट्रिप्सिन जोडने के बाद संवर्धन फ्लास्क से बाहर निकाल देता है। कोशिका सस्पेंशन को 3 से 6 मि.लि.मीडियम के साथ 5 मिनट के लिए 1200rpm और 4°C में सेंट्रिफ्यूज किया जाता है। ऊपर का पानी छोड़ देने के बाद इस में 2 मि ली मीडियम और 2 मि ली मिनिमम एसेन्शियल मीडियम (MEM) और डाइमीथाइल सल्फोक्साइड (DMSD) का 7.5% मिश्रण बूंदों में मिला देता है। 4 मि.ली.सस्पेंशन को चार भागों में बांटकर हिमीकरण कूपिकों में रखा जाता है। कूपिकों के अच्छी

तरह बंद करके लेबल करने के बाद हर एक मिनट में - 1°C की दर में हिमीकरण किया जाता है। तीन स्तरों में हिमीकरण किया जाता है, पहले, 30 मिनट के लिए 0°C तापमान में, इसके बाद 60 मिनट के लिए - 20°C तापमान में और तीसरे स्तर में 6 महीनों के लिए - 70°C तापमान में और अंतिम रूप में द्रव नाइट्रोजन में - 196°C तापमान में एक या दो वर्षों के लिए। स्टोरेज के दौरान कोशिकाएं खराब नहीं होने के लिए मीडियम के साथ DMSO 7.5% और ग्लिसरिन 10% भी उपयुक्त किया जाता है। मुख्यतः तीन कारणों से हिमीकरण किया जाता है।

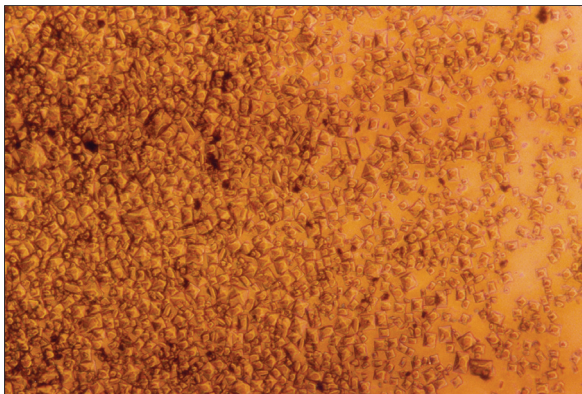
1. सेल लाइन बनते समय कोशिकाओं की एन्जाइम गतिविधियों और क्रोमसोम संख्या आदि में परिवर्तन होता है। इसलिए इन कोशिकाओं को सेल लाइन के निश्चित स्तर तक हिमीकरण किया जाना चाहिए और इसके बाद किया जा सकता है। कोशिकाओं को पुनरुद्भूत किया जा सकता है।

2. सेल लाइन में संदूषण होने की संभावना है। यह रोकने के लिए आवधिक रूप से कोशिकाओं का हिमीकरण



एक्सप्लान्ट से प्रचुरोद्भवन करनेवाली कोशिकाएं किया जाना है।

3. एक सुस्थापित सेल लाइन में कोशिकाओं का केवल 50 बार संवर्धन किया जा सकता है। कुछ अन्य सेल लाइनों में कोशिकाओं का नाश होने की साध्यता है। ऐसी कोशिकाओं का



संवर्धन पात्र में विकसित हुए क्रिस्टल

केवल 30 बार उप संवर्धन किया जा सकता है। इन कोशिकाओं के हिमीकरण से सेल लाइनों की अवधि बढ़ायी जा सकती है।

एबलोन में कोशिकाओं का प्रचुरोद्भवन और नेकर का रूपायन

एक्सप्लान्ट के सभी भागों से कोशिकाओं का प्रचुरोद्भवन होता है। सामान्यतः दो प्रकार की कोशिकाएं होती हैं- कणिकी और अकणिकी. कोशिकाएं एक साथ मिलकर स्यूडोपोडियल नेटवर्क का विकास होता है और इस के बाद पर्ल सैक बन जाता है। बाद में पर्ल सैक जैविक आधार द्रव्य का उत्पादन

करता है और यह क्रिस्टलों का जमाव करने के लिए प्रेरित करता है। इस समय कणिकायुक्त कणिकी कोशिकाएं बढ़ जाती हैं और आधार द्रव्य में कणिकाएं छोड़ देती हैं। कणिकाएं स्वयं बढ़ जाती हैं और क्रिस्टलों के साथ मिलकर नैकर स्तर बन जाता है. नैकर स्तर या मोती जिसमें काल्शियम कोबोनेट दो क्रिस्टलाइन रूपों याने कि अरगोनाइट और काल्साइट जैविक आधार द्रव्य के रूप में दिखाया पड़ता है। अरगोनाइट क्रिस्टल नियमित रूप से जैविक आधार द्रव्य के ऊपर जमाकर मोती बन जाता है। इसके बाद प्रयोगशाला में नियंत्रित स्थितियों में नैकर स्तर बन जाता है और इसके परिणामस्वरूप पात्रे मोती उत्पन्न होता है।

समुद्री अकशेरुकी ऊतक संवर्धन की प्रथम प्रयोगशाला केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान का टूटिकोरिन अनुसंधान केंद्र, टूटिकोरिन में वर्ष 1996 में स्थापित की गयी है और इसे विश्व में पहली बार एबलोन से पात्रे मोती उत्पादन करने की ख्याति प्राप्त हुई है। राष्ट्रीय एवं अंतर्राष्ट्रीय स्तर पर मोती उत्पादन करने वाले मोलस्कों से पात्रे मोती का उत्पादन करने की आधारभूत तकनीक का एकस्व भी इस प्रयोगशाला को प्राप्त है।

मुख्य शब्द/Keywords

एबलोन - Abalone (a marine gastropod mollusc producing pearl)
 पार - paar (a pearl bank)
 खद्दास - khaddas (intertidal reefs)
 मुक्ता शुक्ति - pearl oyster
 रोपण - implantation
 कोशिकोत्पादन - cytogenesis
 श्लेष्मा - mucus
 ऊष्मायित्र - incubator
 निवेशन/संरोपण - inoculation
 सेलवेल - cell well (tissue culture plate)
 सेल लाइन - cell line (specific cells that can

grow indefinitely given the appropriate medium and conditions)
 आधार द्रव्य - organic matrix
 अपकेंद्रण - centrifuging
 अवक्षेप - precipitate
 कर्तौतकी संवर्धन - explant culture
 प्रचुरोद्भवन - proliferation
 पादाभ - pseudopodia
 प्रावार - mantle
 प्रिज़्मीय स्तर - prismatic layer
 षट्कोणीय आकृति - hexagonal form
 अंतरापटलिका - interlamellar



शीशी/कूपिक - vial

हिमीकरण - freezing

पुनरुद्भूत - rejuvenate

कणिकी - granular

अकणिकी - agranular

संतुलित लवण विलयन - balanced salt solution

मुख्य चित्र - प्रात्रेन विकसित किया एबलोन मोती

समुद्री खाद्य मछली संवर्धन में नई आशा - कोबिया

सी एम एफ आर आइ के मंडपम क्षेत्रीय केन्द्र में प्रेरित प्रजनन से कोबिया मछली के संतति विकास सफल हो पाया है। चुने गए मादा और नर अंडजनकों में किए होर्मोनकी प्रयोग से करीबन 2.1 मिलियन अंडे निकल गए जिन में से 90% निषेचित अंडे थे। इन अंडों के स्फुटन से निकले करीबन 1.5 मिलियन संततियों ने सफल रूप से डिंभकावस्था पार किया। संस्थान के विविध केंद्रों में स्थापित पिंजरों में इन मछलियों का पालन अग्रसर है।

